

ANTI-ED B MONOCLONAL ANTIBODY

PUB. NO.: 04-169195 [JP 4169195 A]

PUBLISHED: June 17, 1992 (19920617)

INVENTOR(s): SEKIGUCHI KIYOTOSHI

CHITANI KOUICHI

HIRANO NAONOBU

TACHIKAWA TETSUYA

APPLICANT(s): FUJITA GAKUEN [000000] (A Japanese Company or Corporation),
JP (Japan)

OTSUKA PHARMACEUT CO LTD [350484] (A Japanese Company or
Corporation), JP (Japan)

APPL. NO.: 02-295820 [JP 90295820]

FILED: October 31, 1990 (19901031)

INTL CLASS: [5] C12P-021/08; A61K-039/395; C07K-007/10; C12N-005/20;
C12N-015/06; C12N-015/62; C12P-021/02; G01N-033/574;
G01N-033/577; C12P-021/08; C12R-001/91; C12P-021/02;
C12R-001/19; C07K-099/00

JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 14.1
(ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.4 (ORGANIC
CHEMISTRY -- Medicine); 28.2 (SANITATION -- Medical); 46.2
(INSTRUMENTATION -- Testing)

JOURNAL: Section: C, Section No. 990, Vol. 16, No. 470, Pg. 92,
September 30, 1992 (19920930)

ABSTRACT

NEW MATERIAL: The subject **antibody** recognizing the **ED -B** amino acid
sequence of formula.

USE: Immunoassay of carcinomatous **fibronectin**.

PREPARATION: The **antibody** can be produced by ordinary process using an
immunogen consisting of a fused protein of the 91 amino acids of the **ED -**
B region of formula and protein A.

?logoff hold

14sep00 12:40:34 User228206 Session D1310.10

1645

STIC-FPAS

From: STIC-ILL
Sent: Thursday, September 14, 2000 2:39 PM
To: STIC-FPAS
Subject: RE: edb

-----Original Message-----

From: Raffensperger, Linda
Sent: Thursday, September 14, 2000 2:36 PM
To: STIC-ILL
Subject: RE: edb

Sure, we'll forward it to STIC-FPAS.

-----Original Message-----

From: STIC-ILL
Sent: Thursday, September 14, 2000 2:32 PM
To: Raffensperger, Linda
Subject: RE: edb

-----Original Message-----

From: Portner, Ginny
Sent: Thursday, September 14, 2000 2:24 PM
To: STIC-ILL
Subject: RE: edb

Can this be sent to the foreign patent library?

-----Original Message-----

From: STIC-ILL
Sent: Thursday, September 14, 2000 2:22 PM
To: Portner, Ginny
Subject: RE: edb

Did you mean to send this to STIC-ILL? It appears to be a Japanese patent.

-----Original Message-----

From: Portner, Ginny
Sent: Thursday, September 14, 2000 1:39 PM
To: STIC-ILL
Subject: edb

ANTI-ED B MONOCLONAL ANTIBODY

PUB. NO.: 04-169195 [JP 4169195 A]

PUBLISHED: June 17, 1992 (19920617)

INVENTOR(s): SEKIGUCHI KIYOTOSHI

CHITANI KOUICHI

HIRANO NAONOBU

TACHIKAWA TETSUYA

APPLICANT(s): FUJITA GAKUEN [000000] (A Japanese Company or Corporation),

JP (Japan)

OTSUKA PHARMACEUT CO LTD [350484] (A Japanese Company

or

Corporation), JP (Japan)

APPL. NO.: 02-295820 [JP 90295820]

RECEIVED

SEP 14 2000

STIC FOREIGN PATS BR
COPY SERVICES

1788

FILED: October 31, 1990 (19901031)
INTL CLASS: [5] C12P-021/08; A61K-039/395; C07K-007/10; C12N-005/20;

C12N-015/06; C12N-015/62; C12P-021/02; G01N-033/574;
G01N-033/577; C12P-021/08; C12R-001/91; C12P-021/02;
C12R-001/19; C07K-099/00

JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry);
14.1

(ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.4 (ORGANIC
CHEMISTRY -- Medicine); 28.2 (SANITATION -- Medical); 46.2
(INSTRUMENTATION -- Testing)

JOURNAL: Section: C, Section No. 990, Vol. 16, No. 470, Pg. 92,
September 30, 1992 (19920930)

ABSTRACT

NEW MATERIAL: The subject antibody recognizing the ED -B amino acid sequence of formula.

USE: Immunoassay of carcinomatous fibronectin .

PREPARATION: The antibody can be produced by ordinary process using an immunogen consisting of a fused protein of the 91 amino acids of the ED - B region of formula and protein A.

Ginny Partner

Art Unit 1645
CM1-7e13
(703) 308-7543

NEB

⑪ 公開特許公報 (A) 平4-169195

⑫ Int. Cl.⁵
C 12 P 21/08識別記号
ZNA庁内整理番号
8214-4B
7236-4B
8717-4B
8717-4B⑬ 公開 平成4年(1992)6月17日
C 12 N 5/00
15/00B
C
A※

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全17頁)

⑭ 発明の名称 抗ED-Bモノクローナル抗体

⑮ 特願 平2-295820

⑯ 出願 平2(1990)10月31日

⑰ 発明者	関 口 清 俊	愛知県名古屋市緑区篠の風1丁目1114
⑰ 発明者	千 谷 晃 一	愛知県春日井市岩成台8-3-6
⑰ 発明者	平 野 尚 伸	徳島県鳴門市大津町木津野字4丁野32-9
⑰ 発明者	立 川 哲 也	徳島県板野郡北島町高房字東野神本13-6
⑰ 出願人	学校法人藤田学園	愛知県豊明市栄町南館12番地の1
⑰ 出願人	大塚製薬株式会社	東京都千代田区神田司町2丁目9番地
⑰ 代理人	弁理士 三枝 英二	外2名

最終頁に続く

明細書

発明の名称 抗ED-Bモノクローナル抗体

特許請求の範囲

① 下式(1)で表わされるED-Bのアミノ酸配列を認識することを特徴とする抗ED-Bモノクローナル抗体。

式(1) :

Glu-Val-Pro-Gln-Leu-Thr-Asp-Leu-Ser-Phe-
Val-Asp-Ile-Thr-Asp-Ser-Ser-Ile-Gly-Leu-
Arg-Trp-Thr-Pro-Leu-Asn-Ser-Ser-Thr-Ile-
Ile-Gly-Tyr-Arg-Ile-Thr-Val-Val-Ala-Ala-
Gly-Glu-Gly-Ile-Pro-Ile-Phe-Glu-Asp-Phe-
Val-Asp-Ser-Ser-Val-Gly-Tyr-Tyr-Thr-Val-
Thr-Gly-Leu-Glu-Pro-Gly-Ile-Asp-Tyr-Asp-
Ile-Ser-Val-Ile-Thr-Leu-Ile-Asn-Gly-Gly-
Glu-Ser-Ala-Pro-Thr-Thr-Leu-Thr-Gln-Gln-
Thr

② ED-B領域91アミノ酸とプロテインAと

の融合蛋白質を免疫原として得られる請求項①に記載の抗ED-Bモノクローナル抗体。

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、抗ED-Bモノクローナル抗体、より詳しくはフィブロネクチン(fibronectin: FN)、特に癌組織に含まれるタイプの上記FNに対する新規なモノクローナル抗体に関する。

従来の技術

FNは、1948年にモリソンらにより血漿蛋白質の一つとして初めて報告されたものであり [Morrison, P. R. et al., J. Am. Chem. Soc., 70, 3103 (1948)]、種々の組織や体液中に広く分布する一群の多機能糖蛋白質であり、細胞の接着因子として、細胞の移動、分化、増殖、癌化といった多彩な生物現象に関与することが知られている [関口清俊、細胞工学、4(6), 485-497 (1985)]。

また從来より FNには、2つの分子種があり、肝臓で合成され血液中に存在する FNは血漿 FN (p FN)と呼ばれ、培養細胞表面及び培養液中に存在する FNは細胞性 FN (c FN)と呼ばれていたが、之等 FNの分子多様性は、遺伝子初期転写産物の可変的スプライシング (alternative splicing)により生じることが明らかにされている。かかる可変的スプライシングを受ける領域には、ED-A、ED-B及びIII c sと呼ばれる3領域があり、之等領域の発現の組合せによって、多数の分子種が生じるものと考えられている。

一方、癌組織に含まれるタイプの FN(以下「癌性 FN」と略称する)は、上記 ED-B 領域の発現が異常に高い FNであって、91アミノ酸からなる ED-B 領域を有する FNとして知られている [Luciano Zardi, et al., The EMBO Journal, 6, (8), 2337-2342 (1987)]。

発明が解決しようとする課題

-Bのアミノ酸配列を認識することを特徴とする抗 ED-B モノクローナル抗体が提供される。

式(1) :

Glu-Val-Pro-Gln-Leu-Thr-Asp-Leu-Ser-Phe-
Val-Asp-Ile-Thr-Asp-Ser-Ser-Ile-Gly-Leu-
Arg-Trp-Thr-Pro-Leu-Asn-Ser-Ser-Thr-Ile-
Ile-Gly-Tyr-Arg-Ile-Thr-Val-Val-Ala-Ala-
Gly-Glu-Gly-Ile-Pro-Ile-Phe-Glu-Asp-Phe-
Val-Asp-Ser-Ser-Val-Gly-Tyr-Tyr-Thr-Val-
Thr-Gly-Leu-Glu-Pro-Gly-Ile-Asp-Tyr-Asp-
Ile-Ser-Val-Ile-Thr-Leu-Ile-Asn-Gly-Gly-
Glu-Ser-Ala-Pro-Thr-Thr-Leu-Thr-Gln-Gln-
Thr

また本発明によれば、上式(1)のアミノ酸配列で表わされる ED-B 領域 91 アミノ酸とプロテイン Aとの融合蛋白質からなるペプチドが提供される。

上記及び以下の本明細書において、アミノ酸、

かかる現状において、上記癌性 FNについて分子レベルでの研究を進めるために、またその分子種に特異的な測定(検出)乃至精製を可能とし、ひいては癌の診断を可能とするための手段が、斯界で要望されている。

本発明の目的は、上記要望に合致する手段を提供することにある。即ち、本発明は ED-B を特異的に認識し、従って癌性 FN に反応特異性を有するモノクローナル抗体を提供すること、ED-B に関連するペプチド、殊に上記モノクローナル抗体の製造のための免疫原及び癌性 FN の測定のためのトレーサーとなり得る特定のペプチドを提供すること、更に之等を利用して所望の癌性 FN もしくは ED-B を、従来の固相系のみならず液相系においても測定する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明によれば、下式(1)で表わされる ED

ペプチド、保護基、活性基、その他に関して略号で表示する場合は、IUPACの規定或いは当該分野における慣用記号に従うものとする。また塩基配列における核酸の表示も同様とする。

本発明により提供される上記特定の抗 ED-B モノクローナル抗体は、ED-B を特異的に認識する抗体であって、ED-B もしくは該領域を有する FN、即ち癌性 FN に反応特異性を有することにより特徴付けられる。

従って、本発明抗体は、ED-B もしくは癌性 FN の免疫測定法における特異抗体として利用することができ、これによって之等の高感度、高精度且つ簡便な測定法を確立できる。また、上記測定法が確立できれば、癌のスクリーニング並びに診断技術が提供できると共に、これは発癌機構の研究、解明等の基礎研究に極めて有用である。

更に、本発明抗体は、例えばアフィニティーコロマトグラフィー等による上記 ED-B もしくは

癌性 FN の免疫学的精製に有用である。

また、本発明により提供される上記特定のペプチド (ED-B・プロテインA融合ペプチド) は、本発明抗 ED-B 抗体の製造のための免疫原として有用であり、また上記測定方法におけるトレー サー (標識体) 等としても有効に利用できる。

以下、本発明抗体の製造方法につき詳述する。

本発明抗体は、前記式 (1) で表わされる ED-B 領域 91 アミノ酸とプロテイン A との融合蛋白質を免疫原として用いて、一般的な方法に従い製造することができる [Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 15, 105 (1975); Hanfland, P., Chem.

Phys. Lipids, 10, 201 (1976); Koscielak, J., Eur. J. Biochem., 37, 214 (1978)]。

尚上記 ED-B 領域は公知でありその遺伝子も決定されている。

上記方法はより具体的には、例えば上記免疫原で免疫した哺乳動物の形質細胞 (免疫細胞) と哺

乳動物の形質細胞腫細胞との融合細胞 (ハイブリドーマ) を作成し、これより FN の ED-B 領域を認識する所望抗体 (モノクローナル抗体) を産生するクローンを選択し、該クローンを培養することにより実施される。

本発明抗体は上記方法により得られる粗精抗体液、即ち抗体産生ハイブリドーマ培養上清又はマウス腹水そのままであってもよく、更に之等を硫酸アンモニウム分画やイオン交換クロマトグラフィーやプロテイン A 抗原カラム等によるアフィニティクロマトグラフィー等により精製したものであってもよい。

本発明抗体の製造に当り、免疫原として用いられる上記 FN の ED-B 領域 91 アミノ酸とプロテイン A との融合蛋白質は、前記式 (1) で表わされるアミノ酸配列を少なくとも有している限り、特に限定ではなく、例えば癌組織から調製した癌性 FN、遺伝子組換え技術に従い製造された癌性

FN、それら癌性 FN の ED-B 領域乃至はそれらのフラグメント、上記特定のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等のいずれかとプロテイン A との融合蛋白質であればよい。之等の内で特に好ましいものとしては、本発明 ED-B 領域 91 アミノ酸をハプテンとして利用して得られるものを例示できる。

上記 ED-B 領域 91 アミノ酸とプロテイン A との融合蛋白質は、より好ましくは FN の ED-B 領域を有する癌性 FN の樹立細胞株を利用して、遺伝子工学的手法により製造することができる。その詳細は次の通りである。

即ち、まず癌性 FN を產生する培養樹立細胞株、例えば代表的にはヒト胎児肺組織から分離された正常 2 倍体腺緑芽細胞 WI-38 を腫瘍ウイルス SV 40 で形質転換 (癌化) して得られる株化細胞である WI-38 VA 13 細胞より、グアニジンチオシアネート法 [Chirgwin, J. M. et al.,

Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)] にて、全 RNAを得た後、この RNA からオリゴ d T セルロースカラムにてポリ (A⁺) RNA を選別し、次いでカワサキとウォングの方法 (Kawasaki and Wang, PCR Technology, H.A.Erlich, ed., Stockton Press, New York, p89-98 (1989)) に従って、ポリメラーゼ・チエイン・リアクション法 (以下これを「PCR 法」と略す、Saiki, R. K., et al., Science, 230, 1350-1354 (1985)) を用いて ED-B 領域をコードする cDNA を合成する。

即ち、ランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素により一本鎖 cDNA を合成した後、5'-CAGAGCTCCTGCACCTTTGA-3' を上流プライマー、3'-TGTGACTGTGTTGTTGCC-5' を下流プライマーとして、PCR 法により FN cDNA 上の ED-B 領域をコードする Sac I - Pvu II 領域を増幅することができる。ここで用いられる 2 本のプライマ

ーは、特に上記塩基配列に限定される必要はなく目的の *Sac* I 又は *Pvu* II 部位を含むものであればいずれでもよい。上記で得られる二本鎖 cDNA を *Sac* I 及び *Pvu* II で切断後、FN cDNA を含むプラスミド pLF5 [K. Sekiguchi et al., *Biochemistry*, 25, 4936-4941 (1986)] から切り出した FN cDNA の *Pvu* II - *Acc* I 断片と共に、プラスミド pGEM4 [プロメガ社より市販] の *Sac* I - *Acc* I 部位に挿入し、FN の ED-B 及びその周辺領域をコードする cDNA クローン (pGEMB1) を得ることができる。

次に、上記 pGEMB1 から ED-B を含む領域をコードする cDNA を、*Eco* RI - *Pst* I 断片として回収し、これをプロテイン A 遺伝子融合ベクター pRIT2T [ファルマシア社製] の *Eco* RI - *Pst* I 部位に挿入して、目的のプロテイン A と ED-B との融合蛋白質の発現ベクター pPAB1 を得る。

所望の免疫原を得る。

尚、上記方法においては ED-B 遺伝子を、ED-B 領域をコードする *Sac* I - *Pvu* II 断片とその下流の *Pvu* II - *Acc* I 断片とに分割して pGEM4 ベクターにクローニングしているが、特にその必要はなく、例えば初めから *Sac* I - *Acc* I 断片を PCR 法により増幅させて用いることもできる。更に上記遺伝子は、ホスファイト・トリエステル法 [*Nature*, 310, 105 (1984)] 等の常法に従って、核酸の化学合成により全合成することも可能である。

本発明モノクローナル抗体の製造において、免疫原、即ち上記プロテイン A と ED-B 領域との融合蛋白質で免疫される哺乳動物としては、特に制限はないが、細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択されるのが望ましく、一般にはマウス、ラット等が有利に用いられる。

免疫は一般的方法により、例えば上記免疫原又

上記発現ベクターによる宿主の形質転換は、例えは宿主細胞として *EC1857* 温度感受性リプレッサーをもつ大腸菌 N4830 [ファルマシア社より入手] を用いて、リン酸カルシウム法 [D. Hanahan, D. M. Glover, ed., *DNA cloning*, vol. 1, p109-135, IRL Press, Oxford, 1985] にて行なうことができる。かくして得られる形質転換体を LB 培地で培養後、ハナハンとメセルソンの方法 [Hanahan, D. and Meselson, M., *Gene*, 10, 63-67 (1980)] を参照して、クローニングを行なうことにより、目的とするプロテイン A - ED-B 融合蛋白質陽性クローンを獲得できる。

目的融合蛋白質の产生は、上記陽性クローンを単離後、培養し、ヒートインダクションをかけることにより実施でき、得られる蛋白質は超音波破碎により菌体中より放出させて回収でき、またイムノグロブリン不溶化カラムを用いたクロマトグラフィーにより精製できる。かくして精製された

は後記するような適当な結合試薬を用いて担体（抗原性の高い異種蛋白）と結合させた免疫抗原を、哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等により投与することにより実施できる。

上記免疫抗原の製造において、用いられる担体としては、通常抗原の作成に当たり慣用される高分子の天然もしくは合成の蛋白質を広く使用できる。該担体としては例えば馬血清アルブミン、牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、人血清アルブミン、ヒツジ血清アルブミン等の動物の血清アルブミン類；馬血清グロブリン、牛血清グロブリン、ウサギ血清グロブリン、人血清グロブリン、ヒツジ血清グロブリン等の動物の血清グロブリン類；馬チログロブリン、牛チログロブリン、ウサギチログロブリン、人チログロブリン、ヒツジチログロブリン等の動物のチログロブリン類；馬ヘモグロビン、牛ヘモグロビン、ウサギヘモグロビン、人ヘモグロビン、ヒツジヘモグロビン等の動

物のヘモグロビン類；キーホールリンベットヘモシアニン（K L H）等の動物のヘモシアニン類；回虫より抽出された蛋白質（アスカーリス抽出物、特開昭56-16414号公報、J. Immun., 111, 260-268 (1973)、J. Immun., 122, 302-308 (1979)、J. Immun., 98, 893-900 (1967)及びAm. J. Physiol., 199, 575-578 (1960)に記載のもの又はこれらを更に精製したもの）；ポリリジン、ポリグルタミン酸、リジン-グルタミン酸共重合体、リジン又はオルニチンを含む共重合体等を挙げることができる。

ハプテン-担体結合試薬としては、通常抗原の作成に当り慣用されているものを広く使用できる。具体的にはチロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋結合させる、例えばビスジアゾタイズドベンジジン（B D B）、ビスジアゾタイズド-3, 3'-ジアニシジン（B D D）等のジアソニウム化合物；アミノ基とアミノ基とを架橋結合させる、

例えばグリオキサール、マロンジアルデヒド、グルタルアルデヒド、スクシンアルデヒド、アジポアルデヒド等の脂肪族ジアルデヒド類；チオール基とチオール基とを架橋結合させる、例えばN, N'-オーフエニレンジマレイミド、N-N'-m-フェニレンジマレイミド等のジマレイミド化合物；アミノ基とチオール基とを架橋結合させる、例えばメタマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、4-(マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-スクシニミジル-3-(2-ビリジルジシクロ)プロピオネット(S P D P)等のマレイミドカルボキシル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル類；アミノ基とカルボキシル基とをアミド結合させる通常のペプチド結合形成反応に用いられる試薬、例えばN, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド(D C C)、N-エチル-N'-ジメチル

アミノカルボジイミド、1-エチル-3-ジイソプロピルアミノカルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミド等のカルボジイミド類等の脱水縮合剤等を挙げることができる。また上記ハプテン-担体結合試薬としては、p-ジアゾニウムフェニル酢酸等のジアソニウムアリールカルボン酸類と通常のペプチド結合形成反応試薬、例えば上記脱水縮合剤とを組合せたものも使用可能である。

上記ハプテン、担体蛋白、ハプテン-担体結合試薬、スペーサー等を用いる免疫抗原の製造反応は、常法に従うことができ、一般には水溶液もしくはpH 5~10程度の通常の緩衝液中、好ましくはpH 6~9程度の緩衝液中、0~40℃、好ましくは室温付近で行なわれる。該反応は通常約2~5時間程度で完結する。

上記においてハプテン、ハプテン-担体結合試薬及び担体の使用割合は、適宜に決定できるが、

通常ハプテンに対して担体を0.5~5倍重量程度、好ましくは1~2倍重量程度、及びハプテン-担体結合試薬を1~30倍モル程度用いるのがよい。上記によりスペーサーを仲介してもしくは直接に担体とハプテンとが結合したハプテン-担体複合体からなる所望の免疫抗原が収得される。

反応終了後得られる抗原は常法に従い、例えば透析法、ゲル汎過法、分別沈澱法等により容易に単離精製できる。

前記免疫は、より具体的には、免疫原を生理食塩水含有リン酸緩衝液(P B S)や生理食塩水等で適当な濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2~14日毎に数回投与し、総投与量が、例えばマウスでは約10~100μg程度、家兔では約0.2~2.0mg程度になるようにすることにより行ない得る。上記アジュバントとしては、百日咳ワクチン、完全フロインドアジュバント、アラム等を用い得る。

抗体の採取は、上記最終投与の1～2週間経過後、免疫化された動物から採血し、これを遠心分離後、血清を分離することにより行なわれる。

上記モノクローナル抗体の製造において用いられる免疫細胞としては、上記最終投与の約3日後に摘出した脾臓細胞を使用するのが好ましい。

上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物の形質細胞腫細胞としては、既に公知の種々のもの、例えばp3/X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495-497 (1975)]、p3/X63-Ag8.U1(P3U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、P3/NS1-1-Ag4-1(NS-1) [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)]、Sp2/0-Ag14(Sp2/0) [Nature, 276, 269-270 (1978)]、FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)]等やラットにおける210.RCY3.Ag1.2.3.

RPMI-1640培地、MEM培地、その他この種細胞培養に一般に利用されるものを例示でき、通常之等培地は牛胎児血清(FCS)等の血清補液を抜いておくのがよい。

細胞融合は上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との所定量を上記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば平均分子量1000～6000程度のものを、通常培地に約30～60w/v%の濃度で加えて混ぜ合せることにより行なわれる。以後、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰返すことにより所望のハイブリドーマが形成される。

得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む培地)で培養することにより行なわれる。該HAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに充分な時間、通

(Y3) [Nature, 277, 131 (1979)]等の骨髓腫細胞等を使用できる。

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合反応は、公知の方法、例えばマイルスティーン(Milstein)らの方法 [Method in Enzymology, 73, 3 (1981)]等に準じて行なうことができる。より具体的には、上記融合反応は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等の存在下に、通常の培地中で実施され、培地には更に融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもできる。また、電気処理(電気融合)による方法等を適宜採用することもできる。免疫細胞と形質細胞腫細胞との使用比は、通常の方法と変りはなく、例えば形質細胞腫細胞に対して免疫細胞を約1～10倍程度用いるのが普通である。融合反応時の培地としては、上記形質細胞腫細胞の増殖に通常使用される各種のもの、例えば

常数日～数週間行なえばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とする抗体の検索及び单一クローン化に供される。

目的抗体産生株の検索は、例えばELISA法 [Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980)]、ブラーク法、スポット法、凝聚反応法、オクタロニー(Ouchterlony)法、ラジオイムノアッセイ(RIA)法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法(「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dブリニング発行、第30-53頁、昭和57年3月5日)に従い実施することができ、この検索には前記免疫抗原が利用できる。

かくして得られる本発明の所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することができ、また液体窒素中で長期間保存することができる。

上記ハイブリドーマからの本発明モノクローナ

ル抗体の採取は、該ハイブリドーマを、常法に従って培養してその培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

また上記のごとくして得られる抗体は、更に塩析、ゲル汎過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により精製することができる。

かくして、本発明抗ED-Bモノクローナル抗体を製造できる。

本発明抗体の利用につき詳述すれば、該抗体はこれをを利用して例えば免疫沈降法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の精製手段によりFNのED-B領域を、簡便且つ特異的に精製することができる。また本発明抗体の利用によれば、体液等を検体として該検体中の癌性FNを免疫反

応により特異的に測定することができる。該方法としては、通常の競合法、サンドイッチ法によるラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、凝集法等の通常の免疫学的手段が挙げられ、之等各方法の操作、手順等は常法に従うことができる。

より具体的には、例えば競合法を実施する場合、測定しようとする検体中の癌性FNと、一定量の不活性化されたFNのED-Bとを、標識剤で標識された本発明抗体の一定量と競合反応させ、次いで不溶化FNのED-Bと標識抗体との結合体及び非結合標識抗体とを分離し、そのいずれか一方の標識活性を測定することにより、検体中の癌性FNを定量することができる。またサンドイッチ法を実施する場合、測定物質(検体)と不溶化された本発明抗体とを反応させて、FNのED-B不溶化抗体複合体を形成させ、この複合体に、標識抗体の一定量を反応させ、次いで形成される

複合体と標識抗体との結合体の標識活性又は非結合標識活性を測定することにより、上記と同様に検体中の癌性FNを定量できる。

上記各種の検定法において、検体としては、体液例えは血液、尿、細胞組織液等を使用でき、之等の内では血液、特に血清又は血漿が好ましい。

標識剤で標識された本発明抗体及び標識抗体の作成は、適当な標識剤を用いて常法に従い実施できる。標識剤としては通常のもの、例えは¹²⁵I、¹³¹I、トリチウム等の放射性物質、グルコアミラーゼ、バーオキシダーゼ(Peroxidase)、キモトリプシノーゲン、プロカルボキシペプチダーゼ、グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、アミラーゼ、ホスホリラーゼ、アルカリ fosfatas、D-Nase、P-Nase、β-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-フォスフェートデハイドロゲナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等の各種酵素試薬等を例示できる。標識化方法としては、例

えば放射性ヨードの場合、クロラミンTを用いる酸化的ヨード化法[W. M. Hunter and F. C. Greenwood; Nature, 194, 495 (1962); Biochem. J., 89, 144 (1963) 参照]等により行なわれ、酵素試薬の導入は、通常のカップリング法、例えはエルランガー(B. F. Erlanger)らの方法[Acta Endocrinol. Suppl., 168, 206 (1972)]及びカロール(M. H. Karol)らの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 57, 713 (1967)]等の方法によって行なうことができる。

また、不溶化された本発明抗体及び不溶化FNのED-B、例えはプレートに物理的又は化学的に固相化したものは、本発明抗体又はED-Bを適当な不溶性担体に化学的又は物理的に結合させることにより製造できる。用いられる担体としてはセルロース粉末、セファデックス、セファロース、ポリスチレン、汎紙、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂、デキストラン、プラス

チックフィルム、プラスチックチューブ、ナイロン、ガラスピース、綿、ポリアミンエチルビニルエーテル-マレイン酸共重合体、アミノ酸共重合体、エチレン-マレイン酸共重合体等を例示できる。上記不溶化は共有結合法としてのジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による担体結合法（架橋試薬としてグルタールアルデヒド、ヘキサメチレンイソシアナート等を使用）、Ug I 反応による担体結合法等の各種化学反応手段、イオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法、ガラスピース等の多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法等により実施できる。

上記検定法における反応（免疫反応）は、通常45℃以下、好ましくは4~40℃の温度で、数時間~24時間程度を要して実施できる。

かくして本発明抗体を用いれば、簡便に、高精度で、検体中の癌性 FN もしくは ED-B を保有する FN を測定することができる。

該細胞はヒト胎児肺組織から分離された正常2倍体腺維芽細胞 WI-38 を腫瘍ウイルス SV40 で形質変換して得られた株化細胞であり、ギラルディ (A. J. Girardi) らによりその性質が明らかにされており [Ann. Med. Exp. Biol. Penn., 44, 242-254 (1966)]、ATCC に ATCC CCL 75. 1 として寄託されている。

上記 WI-38 VA 13 細胞を、フレッシュニー (R. I. Freshney) 著「カルチャーオブアニマルセルズ (Culture of Animal Cells)」の記載 (Alan R. Liss, Inc., New York, 1983) に従い培養した。

トリプシン処理により浮遊させた WI-38 VA 13 細胞を約 10⁶ 個ずつ 15 cm 培養皿（ファルコン組織培養ディッシュ #3025）10枚に播き、10% FCS (牛胎児血清) を含む DME 培地（ダルベッコ改変イーグル培地、ギブコ社製）を用いて 5% CO₂ 存在下で、37℃で 5 日間培

かかる本発明抗体を利用した精製系及び測定系の設定及びその改変乃至応用は、当業者にとり自明である。

発明の効果

本発明によれば、FN の抗 ED-B モノクローナル抗体及びその製造のための免疫原としての FN の ED-B・プロテイン A 融合蛋白質が提供される。本発明抗体の利用によれば癌性 FN の研究や癌の診断法及び治療法が提供される。

実施例

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げるが、本発明は之等に限定されない。

実施例 1

ED-B・プロテイン A 融合蛋白質の製造

① FN の ED-B 領域を含む Sac I ~ Pvu II 断片の調製

a) 細胞の培養

この例では WI-38 VA 13 細胞を用いた。

養し、ラバーポリスマンを用いて細胞を培養皿より剥離し、遠心分離 (500 × g、5 分) により約 1 g の WI-38 VA 13 細胞を回収した。

b) cDNA ライブライマーの調製

上記 a) で得られた細胞約 1 g を 1.5 ml の GTC ホモジネート緩衝液 [5.3 M グアニジニウムチオシアネート、0.02 M N-ラウリルザルコシルナトリウム、0.03 M クエン酸三ナトリウム、0.8% β-メルカプトエタノール、0.7% アンチフォーム 289 (除泡剤、シグマ社製)] を入れたポッター式ホモジナイザーに加えた。

10 往復させた後、内容物をビーカーに移し、2.0 ml のシリジンに 22G の注射針を付けて勢いよく 3 回通しシアリングした。

5.7 M 塩化セシウム及び 0.1 M EDTA を遠心チューブに約 4 ml 入れ、その上に上記ホモジネート約 8 ml を重層後、20℃、32000 rpm で 20 時間遠心分離を行なって全 RNA を回

収した。

全RNAを5mg/ μ l以下の濃度に希釈し、65°Cで7分間インキュベート後、氷冷中で2分間急冷した。等量の2倍オリゴdT結合緩衝液 [1.0M NaCl、20mMトリス-HCl、pH 7.5] 及び1/100容量の20%SDSを添加してよく混合した。次いでオリゴdT結合緩衝液 [0.5M NaCl、10mMトリス-HCl、pH 7.5、0.1%SDS] で平衡化したオリゴdTセルロースカラム(バイオ・ラッド社製)に付加した。未吸着区分を再度65°Cで7分間反応させ、氷冷中で2分間急冷して再度カラムに付加した。カラムを10倍容のオリゴdT結合緩衝液で洗浄し、更に10倍容のオリゴdT洗浄液 [0.1M NaCl、10mMトリス-HCl、pH 7.5、0.1%SDS] を使用して洗浄した。オリゴdTセルロースに結合したA' RNAをオリゴdT溶出液 [10mMトリス-

-HCl、pH 7.5、0.05%SDS] により溶出させた。溶出液に1/25容量の5M NaCl及び2.5容量のエタノールを加え、よく混合して-20°Cで一昼夜放置した。次いでこれを12000 rpmで15分間遠心分離して、ポリA' RNAを沈殿させ、70%エタノールに再度懸濁させて同様に遠心分離し、沈殿を乾燥後、適当量の水に溶かした。

上記方法で得られたポリA' RNAからカワサキとウォングの方法 [Kawasaki and Wang, PCR Technology, H.A.Erlich, ed., Stockton Press, New York, p89-98 (1989)] に従って、cDNAのED-B領域をコードする領域をポリメラーゼ・チエイン・リアクション法により増幅した。

c) プライマーの合成

次の2つのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを調製した。

d) 一本鎖cDNAの合成

0.5 μ lチューブ(エッペンドルフ社製)に、10 μ lの2×反応用緩衝液 [40mMトリス-HCl、pH 8.4、100mM KCl、5mM MgCl₂、0.2mg/ μ lヌクレアーゼフリー牛血清アルブミン、2mM dATP、2mM dGTP、2mM dCTP、2mM TTP、2単位/ μ l RNasin(プロメガ社製)、100Pmolランダムヘキサマー(ファルマシア社製)]と、予め90°Cで5分間熱処理した約1 μ gのRNAを含む溶液9 μ lとを混合した後、1 μ lのマウスマロニー白血病ウィルス由来の逆転写酵素(約200単位)を加え、室温で10分間、更に42°Cで30分間インキュベートして、一本鎖cDNAを合成した。反応液を10分間95°Cで加熱して反応を停止させた。

e) Sac I - Pvu II断片の増幅

上記d)の加熱処理により反応を停止させた一本

上流プライマー(Sac I サイト) :

5'-CAGAGCTCCTGCACTTTGA-3'

上流プライマー(Pvu IIサイト) :

3'-TGTGACTGTGTTGCC-5'

上記プライマーの調製は、自動DNA合成装置(アプライド・バイオシステムズ社製、380A型)を用いて、4種の塩基のβ-シアノエチルホスホアミダイト誘導体より固相法により合成した。合成されたオリゴヌクレオチドの脱保護と固相担体からの遊離は、濃アンモニア水中で55°C下に10時間加温することにより行なった。このようにして調製した合成オリゴヌクレオチドは、HPLCで精製し、最終的に約50 μ gの目的オリゴヌクレオチドをそれぞれ上流プライマー及び下流プライマーとして得た。

得られた精製オリゴヌクレオチドはTE緩衝液 [10mMトリス-HCl、pH 7.4、1mM EDTA] に溶解し、-20°Cで保存した。

鎖cDNA溶液 $20\mu\ell$ に、 50 p mol ずつの上流プライマー及び下流プライマーを含む $80\mu\ell$ の $1\times$ PCR反応用緩衝液[20 mM トリス-HCl、pH 8.4、 50 mM KCl、 2.5 mM MgCl₂、 $0.1\text{ mg}/\mu\ell$ ヌクレアーゼフリー牛血清アルブミン]と、5単位のTaqポリメラーゼ(パークリンエルマー/シータス社製、 $1\mu\ell$)とを加え、 $100\mu\ell$ のミネラルオイルを重層した後、 95°C で1.5分間、次に 50°C で3分間、更に 72°C で3分間加熱する操作を35回繰り返して、所望のED-B領域をコードするSac I - Pvu II cDNA断片を増幅した。反応終了後、10単位のSac Iを添加し、 37°C で2時間インキュベートして、増幅させたSac I - Pvu II cDNA断片の5'側Sac Iサイトを露出させた。

上記反応液について、これを臭化エチジウムの存在下、 $\phi \times 174$ DNAのHae III分解DNA

断片を分子量マーカーとして1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動を行なうことにより、所望の385塩基対の大きさをもつSac I - Pvu II断片が増幅されていることを確認した。

f) Sac I - Pvu II断片の精製

上記e)に従いアガロースゲル上で分離されたSac I - Pvu II断片を、ドレッツェンらの方法[Dretzen, G. M., et al., Anal. Biochem., 112, 295-298 (1981)]を用いて、DEAEセルロース膜(SアンドS社製、NA45)上に吸着させた後、吸着されたDNA断片を溶出バッファー[50 mM トリス-HCl、pH 8.0、 1 M NaCl 、 10 mM EDTA]を用いて、DEAEセルロース膜より溶離させ、その後冷エタノール沈殿により、所望のSac I - Pvu II断片(約 100 ng)を回収した。

② FNcDNA Pvu II - Acc I断片の調製

a) セキグチらにより単離されたヒトフィブロネ

クチンcDNAクローンpLF5 [Sekiguchi, K., et al., Biochemistry, 25, p4936-4941 (1986)] $20\mu\text{g}$ を、 $50\mu\ell$ の反応緩衝液[10 mM トリス-HCl、pH 7.5、 7 mM MgCl_2 、 60 mM NaCl 、 7 mM 2-メルカプトエタノール 、 0.01% 牛血清アルブミン]に溶解し、これに20単位のPvu IIとAcc I(どちらも宝酒造社製)とを加え、 37°C で2時間反応させた。反応終了後、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行なって、所望のPvu II - Acc I断片(226塩基対)を分離し、その後、前記①-e)に記した如く、DEAEセルロース膜を用いて所望のDNA断片(約 500 ng)を回収した。

③ FNcDNAのSac I - Acc I断片のpGEM4へのクローニング

pGEM4(プロメガ社製) $5\mu\text{g}$ を $20\mu\ell$ の反応緩衝液[10 mM トリス-HCl、pH

7.5、 7 mM MgCl_2 、 60 mM NaCl 、 7 mM 2-メルカプトエタノール 、 0.01% 牛血清アルブミン]に溶解させ、これに10単位のSac I(宝酒造社製)と10単位のAcc I(宝酒造社製)とを加えて、 37°C で2時間インキュベートし、pGEM4のポリリンカーネーションをSac IとAcc I部位で開裂させた。反応生成物をフェノール処理した後、エタノール沈殿により開裂させた。プラスミドDNAを回収し、これを $48\mu\ell$ の反応緩衝液[50 mM トリス-HCl、pH 9.0、 0.1 mM ZnCl_2 、 1 mM MgCl_2 、 1 mM スペルミジン]に溶解させ、これに20単位の牛小腸アルカリファスファターゼ(宝酒造社製)を加えて、 37°C で1.5分間、次いで 56°C で1.5分間加温して、5'末端の脱リン酸化を行なった。

10% SDSを $2.5\mu\ell$ 加えた後、 68°C で1.5分間加温して酵素を失活させ、フェノール抽

出の後にエタノール沈殿を行なって、5'末端を脱リン酸化したプラスミドDNAを回収した。

次に、上記プラスミドDNA 2.0 ngと、上記①及び②で得られた各cDNA断片のそれぞれ2.0 ngとを、2.4 μlのライゲーション緩衝液 [6.6 mMトリス-HCl、pH 7.0、5 mM MgCl₂、5 mMジチオスレイトイル、1 mM ATP]に溶解させ、これにT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)300単位を加えて16℃で16時間インキュベーションし、pGEM4のSac I - Acc I部位にFNのED-B領域をコードするSac I部位からAcc I部位までのcDNA断片を挿入した。

次に、この反応液1 μlを分取し、これを100 μlのE. coli HB101コンピテント細胞(宝酒造社製)と混和後、氷冷下で30分間、次いで42℃で90秒間インキュベーションして、プラスミドDNAを大腸菌に導入した。これに

LB培地 [1%バクト・トリプトン、0.5%酵母抽出液、1%食塩]を1 ml加えて、37℃で1時間振盪培養した後、その100 μlを分取して、アンビシリン50 μg/mlを含むLB寒天プレート [1.5%バクトアガーベー、1%バクト・トリプトン、0.5%酵母抽出液、1%食塩]上に播き、37℃で14時間インキュベートしてプラスミドDNAにより形質転換した大腸菌のコロニー約200個を得た。この中から12個を無作為に採取し、50 μg/mlのアンビシリンを含むLB培地で培養後、バイルンボインとドリー[Birnblum and Doly]の変法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis et al., ed. p368-389 (1982)]により各コロニーからプラスミドDNAを回収した。Eco RIとPst Iの二重消化により、予想される約600塩基対の挿入配列を有するプラスミドクローン(pGEMB1)を選別した。

④ pGEMB1からのEco RI - Pst I断片の回収

a) プラスミドDNAの単離

上記③で得られたプラスミドクローンpGEMB1を含む大腸菌株を、50 μg/mlのアンビシリンを含むLB培地500 mlを用いて、37℃で12時間培養した。その後、5000×g、10分の遠心により菌体を回収し、アルカリ溶菌法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis et al., ed. p90-91 (1982)]により、以下の通りプラスミドDNAを単離した。

即ち、菌体を、8 mlのリゾチーム5 mg/mlを含む緩衝液I [5.0 mMグルコース、2.5 mMトリス-HCl、pH 8.0、0.1 mM EDTA]に懸濁させ、室温で5分間放置した後、これに16 mlの0.2N NaOH/1% SDS溶液を加えて素早く混和し、氷冷下で10分間溶菌させた。次に12 mlの氷冷した5M酢酸カリウム溶液

(pH 4.8)を加えて混和し、更に氷冷下に10分間放置した。

上記の後、20000 rpm、20分間、4℃で遠心し、上清32 mlを16 mlずつ2本のコレッキスガラス遠心管に移し、それぞれに10 mlのイソプロパノールを加えて室温で15分間放置した後、12000×g、30分間、15℃で遠心し、プラスミドDNAを沈渣として回収した。

この沈渣を風乾した後、8 mlのTE緩衝液 [1.0 mMトリス-HCl、pH 8.0、0.1 mM EDTA]に溶解し、これに8 gの塩化セシウムと0.4 mlの1 mg/mlの臭化エチジウム溶液とを加え、よく混和した後、2000 rpm、5分間室温にて遠心して不溶物を除いた。上清を12 PAシールチューブ(日立工機製)に移し、チューブ上部をミネラルオイルで満たした後、55000 rpm、16時間、19℃で遠心して、プラスミドDNAのバンドを形成させた。次に、

注射針を用いてプラスミドDNAを回収し、エタノール沈殿によって所望のpGEMB1プラスミドDNA(約200μg)を得た。

b) Eco RI - Pst I断片の回収

上記a)で得られたpGEMB1プラスミドDNA 5 μgを、25 μlのEco RI - Pst I用反応緩衝液[10 mMトリス-HCl、pH 7.5、10 mM MgCl₂、50 mM NaCl、1 mMジチオスレイトール]に溶解し、10単位のEco RIと10単位のPst Iとを加えて、37°Cで2時間インキュベートし、プラスミドDNAをEco RI部位とPst I部位で切断した。得られた反応液より1.5%アガロースゲル電気泳動により、所望のEco RI - Pst I断片を分離し、前記①に記したDEAEセルロース膜を用いる方法により所望のDNA断片(約300ng)を回収した。

⑤ Eco RI - Pst I断片のpRIT2Tへの挿入

a) プラスミドベクターの製造

に記載のライゲーション緩衝液24 μlに溶解し、これに300単位のT4 DNAリガーゼを加えて、16°Cで16時間インキュベートして、pRIT2Tのポリリンカー領域にpGEMB1由来のEco RI - Pst I断片を挿入した。

c) 形質転換体の作製

上記b)で得られた反応液1 μlを用いて、前記③に記した方法に従い、大腸菌E. coli HB101株を形質転換し、9 cmのLB寒天プレート上に約50個のコロニーを得た。この中から無作為に12個のコロニーを別々に採取し、1.5 mlのアンビシリンを含むLB培地で培養した後、バイルンボインとドリー[Birnblum and Dolly]の変法により、各コロニーからプラスミドDNAを回収した。かくして得られたプラスミドDNA(約1 μg)を、Eco RI - Pst I用反応緩衝液10 μlに溶解した後、Eco RIとPst Iとをそれぞれ5単位ずつ加えて、37°Cで2時間インキュベートし、

プロテインA遺伝子融合ベクター-pRIT2T(ファルマシア社製)2 μgを、Eco RI - Pst I用反応緩衝液20 μlに溶解し、Eco RIとPst Iとをそれぞれ10単位ずつ加えて、37°Cで2時間インキュベートし、Eco RI - Pst I部位でプラスミドDNAを開裂させた。反応生成物をフェノール抽出した後、エタノール沈殿により開裂したプラスミドDNAを回収し、その5'末端を前記③に記載した方法に従って、牛小脳アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化し、再度フェノール抽出を行なった後、エタノール沈殿により所望のプラスミドベクター1 μgを得た。

b) プラスミドベクターへのEco RI - Pst I断片の挿入

上記c)に従いEco RIとPst Iとで開裂され、その5'末端を脱リン酸化されたpRIT2Tプラスミド20ngと、前記④で調製されたpGEMB1由来のEco RI - Pst I断片20ngとを、前記③

得られた反応生成物を1%アガロースゲル電気泳動により分析して、623塩基対のEco RI - Pst I断片が生成しているクローン(pPAB1)を同定した。

d) 上記c)で同定されたプラスミドpPAB1を有する大腸菌株を500 mlのアンビシリソウ LB培地を用いて培養し、前記④のb)に示したアルカリ溶菌法に従って、所望のプラスミドDNA pPAB1約300 μgを得た。

⑥ プラスミドpPAB1の大腸菌N4830への導入

上記d)で得られたpPAB1プラスミドDNAを、マンデルとヒガ(Mandel and Higa)のリン酸カルシウム法[J. Mol. Biol., 53, 154 (1970)]に従って、大腸菌N4830(ファルマシア社より入手)に、以下の通り導入した。

即ち、LB培地100 ml中で大腸菌N4830を37°Cで振盪培養し、菌体密度が約5×10⁷

/ml となったところで培養を止め、水浴中で急冷した。4000×gで5分間、4℃で遠心して集菌した後、沈渣を50mlの氷冷した50mM塩化カルシウム-10mMトリス-HCl (pH 8.0) に懸濁させ、水浴中で15分間静置した後、4000×gで5分間、4℃で遠心分離した。得られた沈渣を7mlの氷冷した50mM塩化カルシウム-10mMトリス-HCl (pH 8.0) の溶液に再懸濁させ、氷冷中に静置した。かくして調製した大腸菌の懸濁液0.2mlにTE緩衝液に溶解させたpPAB1プラスミド溶液10μl (プラスミドDNA 1.0ngを含む) を加え、氷浴中で30分間静置した後、42℃の温湯中にて2分間加温し、次に1mlのLB培地を加えて、37℃で1時間インキュベートした。かくして得られた大腸菌懸濁液100μlを前記した組成のアンビシリソを含むLB寒天培地上に播布し、37℃で14時間インキュベートして、形質転換した大

腸菌コロニーを寒天培地上に生じさせた。

⑦ プロテインA-ED-B融合蛋白質の単離

上記⑥で得られた形質転換体 (プラスミドpPAB1で形質転換した大腸菌N4830) を、500mlのLB培地で30℃で14時間、振盪培養した後、予め54℃に加温した500mlのLB培地を加え、更に42℃の温湯中で90分間振盪培養して、プロテインA-ED-B融合蛋白質の発現を誘導した。

その後、5000×gで15分間、4℃で遠心して菌体を回収し、これを氷冷したトリス緩衝生理食塩水 [50mMトリス-HCl、pH 7.6、150mM NaCl] 100mlに懸濁させ、氷浴中にて超音波破碎 (ブランソン社製、ソニファイア-250を使用し、出力設定7にて3分間の処理を3回繰り返す) することにより、菌体中の蛋白質を放出させた。この破碎液約100mlを遠心分離 (16000×g、20分、4℃) して上

清画分約95mlを回収し、300mlのトリス緩衝生理食塩水を加えて希釈した後、約10mlの1gG-セファロース6ファーストフロー (ファルマシア社製) を充填したカラムに添着して、プロテインA-ED-B融合蛋白質をカラムに吸着させた。該カラムを100mlのトリス緩衝生理食塩水、次に20mlの5mM酢酸アンモニウム溶液 (pH 5.0) でそれぞれ洗浄した後、吸着した蛋白質を0.5M酢酸溶液にて溶出させた。かくして得られたプロテインA-ED-B融合蛋白質をトリス緩衝生理食塩水に対して二昼夜透析して、所望の抗原約1mgを得た。

実施例 2

ハイブリドーマの作製

実施例1で得られた精製ED-B-プロテインA融合蛋白質の0.05mgを、0.5mlのPBSで希釈した後、同量のフロイント完全アジュvant (complete Freund's adjuvant) と混合乳化さ

せ、これを0.2mlずつ、雄のBalb/cマウス (8週齢) に皮内投与した。その後、同様にして4回、2週間おきに追加投与して免疫し、最終免疫の3日後に脾臓を摘出した。

摘出脾臓より脾細胞を取り出し、該細胞中に存在する赤血球を0.83%塩化アンモニウム液で4℃下に1~2分間処理して融解除去した。上記で得られた細胞を感作リンパ球細胞として集め、37℃に加温したRPMI-1640培地で3回洗浄した。

次にマウス骨髄腫細胞 [P3U1、Current topics in Microbiology and Immunology, 73, p3 (1981) 等参照] を、15%FCS (牛胎児血清) を含有するRPMI-1640培地に8-アザグアニン100μMを加えた培地中で、継代培養し、これをミエローマ細胞として用い洗浄した。

上記ミエローマ細胞と骨髄腫細胞を細胞数比10:1になるように50mlのチューブ内で混和

し、得られた細胞混合物を $500\times g$ で5分間遠心後、上清をバストールビペットで完全に除去した。之等の操作は37℃に保温した水槽内にて行なった。

次に35%ポリエチレングリコール1500（和光純薬社製、以下PEGと略称する）4mLを加えて、ゆっくりと1~2分間かき混ぜ、1分間放置し、次いで37℃に保温したFCSを含まないRPMI-1640培地2mLをゆっくりと1分間位かけて加え、1分間放置し、更に同液4mLを加えて2分間放置し、更に同液4mLを加えて4分間放置した。次いで、37℃に保温した15%FCS、0.05%カロム/μの硫酸ストレプトマイシン、60000U/μのペニシリンGカリウム、54mg/μのゲンタマイシン及び1mgビルベートを含有するRPMI-1640（以下これを完全RPMI-1640培地という）8mLを2~3分間かけて加えた後、 $500\times g$ で5分間遠心分離

した。上清を吸引除去し、37℃に保温した完全RPMI-1640培地液に、脾細胞 1×10^6 個/mLとなるように懸濁させた。次に、この懸濁液を96ウェルのプレート（コースター社製）に0.1mLずつ分注し、37℃、5%CO₂、100%湿度のインキュベーター内で24時間培養した。その後、各ウェルに、ヒボキサンチン 1×10^{-4} M、アミノブテリン 4×10^{-7} 及びチミジン 1.6×10^{-5} Mを含む10%FCS添加完全RPMI-1640培地（以下これをHAT培地という）の0.1mLずつを添加した。以後、上清を2日目及び3日にそれぞれ0.1mLずつ吸引し、新しいHAT培地0.1mLずつを加えて液交換した。その後、上記液交換を2~3日おきに行なった。6日目に同様に上清を吸引し、ヒボキサンチン 1×10^{-4} M及びチミジン 1.6×10^{-5} Mを含む完全RPMI-1640培地（以下これをHT培地という）に代えた。以後、完全

RPMI-1640培地で増殖維持した。

上記操作による細胞融合後、10~14日間でコロニーが肉眼で観察されるようになった。細胞が96ウェルプレートの底面積の1/4を占めた時より、ED-Bを保持したヒト胎盤由来FNを抗原とする酵素免疫法（ELISA法）にて、培養上清を試験し、陽性となつたウェルから直ちに限界希釈法（Method in Enzymology, 73, 3 (1981)）により、ハイブリドーマのクローニングを行なった。

即ち、Balb/c系マウス胸腺細胞 1×10^8 個を含むように調製した10%FCS添加RPMI-1640培地の20mLを用いて、ハイブリドーマを3個/ウェル、1個/ウェル及び0.3個/ウェルとなるように6ウェルプレートに0.2mLずつ播いてクローニングを行ない、目的とするハイブリドーマを樹立した。

上記クローニングは、ヒト正常臍芽細胞WI

-38を腫瘍ウィルスSV40で悪化させた細胞WI-38VA13の培養上清から精製した癌性FN及び胎盤由来FNとの反応性を指標として、血漿型FNとの反応性がないことを確認しながら、上記クローニングを4回行ない、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマ4株を得た。

之等をそれぞれ「OAL-TFN-01」～「OAL-TFN-04」と命名した。

上記で得られたクローンOAL-TFN-01～OAL-TFN-04を、完全RPMI-1640培地にて、5%CO₂条件下で、37℃にて、96時間培養した。培養液を3000rpmで10分間遠心分離して、目的のモノクローナル抗体を含む培養上清を得た。

得られたクローンの内の1株（本発明抗体産生ハイブリドーマOAL-TFN-01）を選定した。

該モノクローナル抗体産生細胞は、工業技術院微生物工業技術研究所に「O A L - T F N - 0 1」なる表示で寄託されており、その寄託番号は「微生物研菌寄第11540号 (PERM P-11540)」である。

上記クローン O A L - T F N - 0 1 の 1 × 10⁶ 個を、予めブリスタン（アルドリッヂ社製）を接種しておいた B a l b / c 系マウスに腹腔内投与した。10 ~ 14 日後、蓄積した腹水を採取し、本発明抗体を含む腹水を得た。

該腹水中の抗体を、ゲルクロマトグラフィー（セファクリール-S-300 使用）及び陰イオン交換クロマトグラフィー（Q-セファロース使用）を用いて精製して、精製抗体 O A L - T F N - 0 1 を得た。

以下、上記で得られた本発明モノクローナル抗体の特性を実施例 3 として示す。

実施例 3

の) 2 μg / ウェルをコートした (4°C、24 時間) 96 ウェルポリスチレンマイクロプレート (NUNC 社製) を、1% B S A のダルベッコリン酸緩衝液 (pH 7.2、以下 D' P B S と略称する) で、4°C、24 時間、ブロックした後、該プレートの各ウェルに実施例 2 で得た本発明抗体を含む培養上清 50 μl を加え、室温で 3 時間反応させた。洗浄用緩衝液 (D' P B S + 0.05% ツイーン 20) で 3 回洗浄後、バーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体 (ザイメント社製) を用いて、F N の E D - B - プロテイン A 融合蛋白質に結合した抗体を測定した。

その結果、培養上清の 1 × 10¹ 倍希釈で充分な発色が認められた。

④ E L I S A 法による標準曲線

本発明モノクローナル抗体を D' P B S にて 25 μg / ml に希釈して、これを 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 100 μl ずつ入れ、

本発明抗体の性状

① 抗体のサブクラス

マウスモノクローナル抗体サブクラス同定用キット (バイオ・ラド (Bio-Rad) 社製) を用いて、本発明抗体のサブクラスを決定した。

その結果上記抗体のサブクラスは、I g M であった。

② 抗体産生レベル

実施例 2 でえた培養上清を遠心分離し、その上清を 10% F C S 添加 R P M I - 1 6 4 0 培地にて、37°C、5% C O₂ の条件で 10 日間インビトロにて培養した。

ハイブリドーマが最大細胞密度になった時の培養上清中の O A L - T F N - 0 1 の I g M 量は、約 5 μg / ml であった。

③ 抗体の力価

E D - B を保持した胎盤由来の F N の精製品 (胎盤をホモジネート後ウレアにより抽出したも

4 度°C で一晩固定後、D' P B S (0.05% ツイーン 20 を含む) で洗浄した。次いで、各ウェルに D' P B S、0.05% チメロザール及び 0.5% 牛血清アルブミン (B S A) を 300 μl ずつ入れ、4°C で一晩ブロッキングを行なった。ブロッキングの後、D' P B S (0.05% ツイーン 20 を含む) で洗浄し、各ウェルに 0.01M リン酸緩衝液 [0.1% N P - 4 0 (NONIDENT P-40、シグマ社製)、0.05% チメロザール、10% F C S、p H 5.5] 100 μl を入れた。更に各ウェルに、種々の濃度に希釈したヒト血漿より精製した F N (p F N) と、ヒト正常臍維芽細胞 W I - 3 8 を腫瘍ウィルスで悪化させた細胞 W I - 3 8 V A 1 3 の培養上清から精製した癌性 F N (c F N) とを、それぞれ 20 μl ずつ加え、室温で 2.5 時間インキュベーションした後、0.05% ツイーン 20 を含む D' P B S で 6 回洗浄した。

更に、上記各ウェルに、バイオチニレート標識 (Biotinylated) した抗 FN モノクローナル抗体 [O A L - p F 1 1 5、シグマ社の p FN を免疫原として樹立したもの、臨床病理、vol. 35補冊、1987年、p119 ; The 18th Congress of the International Association of Medical Laboratory Technologists, Abstracts, p225 (1988) 等参照] ($\times 1000$ 倍希釈液を $100 \mu\text{l}$ / ウェル)、D' PBS ($100 \mu\text{l}$ / ウェル)、0.1% CHAPS (3-[3-クロラミドプロピル]ジメチルアンモニオ] - 1-プロパンスルホネート)、0.1% BSA、0.05% チメロザール溶液; A 緩衝液 $100 \mu\text{l}$ を加えた後、2、5時間インキュベーションし、
0.05% ツイーン 20 を含む D' PBS 洗浄用緩衝液で6回洗浄した。

次に、アビジョン-バーオキシダーゼ複合体 (バイオ・ラッド社製) $100 \mu\text{l}$ / ウェルを A 緩衝

に溶解して添加した後、1時間インキュベーションした。プレートを洗浄用緩衝液で洗浄後、0-フェニレンジアミン溶液 (OPD 溶液) を、ウェル当たり $100 \mu\text{l}$ 加え、室温で10分間反応させた後、 $100 \mu\text{l}$ の 2N 硫酸を加えて反応を停止させ、 492 nm の吸光度を測定した。

上記の結果を第1図に示す。

図において縦軸は 492 nm の吸光度 (OD) を、横軸は FN の濃度を示し、(1) が癌性 FN の結果、(2) が血漿型 FN の結果である。

該図より、本発明抗体は血漿型 FN とは反応せず、癌性 FN と用量依存的に反応することが明らかである。

図面の簡単な説明

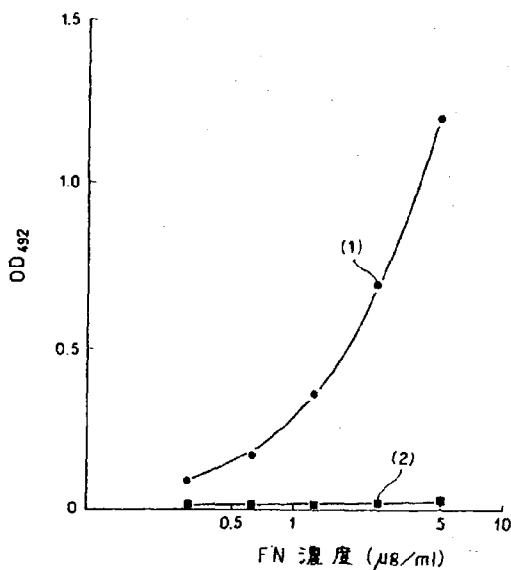
第1図は本発明抗体の各種 FN に対する反応性を調べた結果を示すグラフである。

(以上)

代理人 弁理士 三枝英二



第1図



第1頁の続き

@Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号
// A 61 K 39/395	T	8829-4C
C 07 K 7/10		8318-4H
C 12 N 5/20		
15/06		
15/62		
C 12 P 21/02	C	8214-4B
G 01 N 33/574	Z	9015-2J
33/577		9015-2J
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:19)		
C 07 K 99:00		